



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

**0 051 143**  
**A1**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 81107458.2

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>: **C 12 P 33/06**  
**C 07 J 53/00**  
**//C07J71/00**

(22) Anmeldetag: 19.09.81

(30) Priorität: 03.11.80 DE 3042136

(72) Erfinder: Petzoldt, Karl, Dr.  
Flachsweg 10  
D-1000 Berlin 38(DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
12.05.82 Patentblatt 82/19

(72) Erfinder: Wiechert, Rudolf, Prof.  
Petzower Strasse 8 A  
D-1000 Berlin 39(DE)

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(72) Erfinder: Laurent, Henry, Dr.  
Glambecker Weg 21  
D-1000 Berlin 28(DE)

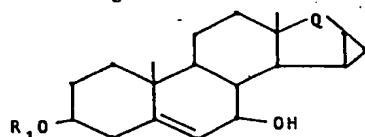
(71) Anmelder: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT Berlin  
und Bergkamen  
Müllerstrasse 170/178 Postfach 65 03 11  
D-1000 Berlin 65(DE)

(72) Erfinder: Nickisch, Klaus, Dr.  
Alt Lichtenrade 11  
D-1000 Berlin 49(DE)

(54) Verfahren zur Herstellung von 3-beta,7-beta-Dihydroxy-delta-5-steroiden.

(72) Erfinder: Bittler, Dieter  
Bölkauer Pfad  
D-1000 Berlin 27(DE)

(57) Ein Verfahren zur Herstellung von 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy- $\Delta^5$ -steroiden der allgemeinen Formel I

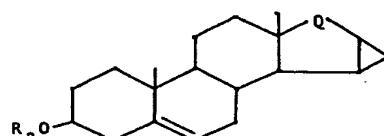


(1).

worin Q die Gruppierungen



und R<sub>1</sub> ein Wasserstoffatom, eine Trimethylacetylgruppe,  
eine tert.-Butyl-dimethylsilylgruppe, eine Dimethyl-2-(3-methylbutyl)-silylgruppe oder eine Tribenzylsilylgruppe darstellen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man ein  
3 $\beta$ -Hydroxy- $\Delta^5$ -steroid der allgemeinen Formel II



(11),

worin Q die obengenannte Bedeutung besitzt und R<sub>2</sub> ein Wasserstoffatom oder eine Alkanoylgruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellt, mit einer Kultur von *Botryodiplodia malorum* fermentiert, und gewünschtenfalls die erhaltenen 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy- $\Delta^5$ -steroids der allgemeinen Formel I mit Trimethylacetanhydrid, tert.-Butyl-dimethyl-silylchlorid, Dimethyl-2-(3-methyl-butyl)-silylchlorid oder Tribenzylsilylchlorid umsetzt.

**EP 0 051 143 A1**

Die Erfindung betrifft das in den Patentansprüchen gekennzeichnete Verfahren.

$3\beta,7\beta$ -Dihydroxy- $\Delta^5$ -sterioide der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 1 sind wichtige Zwischenprodukte zur Partialsynthese pharmakologisch wirksamer Steroide.

Es ist mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens möglich, diese Verbindungen in hoher Ausbeute aus den entsprechenden in 7-Position unsubstituierten Verbindungen darzustellen.

Der erste Reaktionsschritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird unter den Bedingungen durchgeführt, die man üblicherweise bei der mikrobiologischen Hydroxylierung von Steroiden mit Pilzkulturen anwendet. So werden zunächst in allgemein üblichen Vorversuchen die günstigsten Fermentationsbedingungen, wie zum Beispiel Auswahl des günstigsten Nährmediums, des geeigneten Substratlösungs- oder Suspensionsmittels, der Substratkonzentration, der technischen Bedingungen wie Temperatur, Belüftung, pH-Wert und der optimalen Zeiten für Germination, Substratzugabe und Substratkontakt am Enzym des Mikroorganismus analytisch, insbesondere dünnenschichtchromatographisch, ermittelt. Dabei hat sich gezeigt, daß es zweckmäßig ist, Konzentrationen von etwa 100-2 000 mg Substrat pro Liter Nährmedium einzusetzen. Der pH-Wert wird vorzugsweise auf einen Wert im Bereich von 5 - 7 eingestellt. Die Züchtungstemperatur liegt im Bereich von 20 - 40° C, vorzugsweise von 25 - 35° C. Zur Belüftung werden vorzugsweise 0,5 bis 5 Liter Luft pro Minute pro Liter Kulturbrühe zugeführt. Die Umwandlung des Substrates wird zweckmäßigerweise durch dünnenschichtchromatographische Analyse von Probeextrakten verfolgt. Die Fermentationsdauer beträgt etwa 20 bis 80 Stunden.

Nach erfolgter Fermentation werden die Fermentationsprodukte in an sich bekannter Weise isoliert. Die Isolierung kann zum Beispiel in der Weise erfolgen, daß man die Fermentationsansätze mit einem nicht mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel wie Äthylacetat, Butylacetat oder Methylisobutylketon, extrahiert, die Extrakte einengt und die so erhaltenen Rohprodukte gegebenenfalls durch Chromatographie und/oder Kristallisation reinigt.

Bevorzugte Ausgangsverbindungen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind solche der allgemeinen Formel II, welche als Sustituenten R ein Wasserstoffatom, eine Acetylgruppe, eine Propionylgruppe oder Butyrylgruppe tragen.

Es ist überraschend, daß die  $\Delta^5$ -Steroide der allgemeinen Formel II in der  $7\beta$ -Position hydroxyliert werden, denn es ist bekannt, daß die entsprechenden  $\Delta^4$ -Steroide mit *Bortryodiplodia malorum* in der  $7\alpha$ -Position hydroxyliert werden (Europäische Patentanmeldung 0 014 991).

Es ist seit langem bekannt, daß der selektive Schutz der  $3\beta$ -Hydroxygruppe von  $3\beta,7\beta$ -Dihydroxy- $\Delta^5$ -steroiden erhebliche Schwierigkeiten bereitet. (J. Amer. Chem. Soc., 74, 1952, 3310). Die Umsetzung der Verbindungen mit beispielsweise Trimethylacetylchlorid oder Triphenylchlormethan-Agentien, die man konventionellerweise zum selektiven Schutz von sterisch ungehinderten Hydroxygruppen neben sterisch gehinderten Hydroxygruppen anwendet - führt wie eigene Versuche zeigen, nicht zum gewünschten Erfolg.

Überraschenderweise gelingt der selektive Schutz der  $3\beta$ -Hydroxygruppe der Verbindungen der allgemeinen Formel I, wenn man diese Substanzen mit Trimethylacetanhydrid - vorzugsweise unter Verwendung von 4-Dimethylaminopyridin oder

4-Pyrrolidinopyridin als Katalysator - durchführt, oder diese Verbindungen mit tert.-Butyl-dimethylsilylchlorid, mit Dimethyl-2-(3-methyl-butyl)-silylchlorid oder Tribenzylysilylchlorid- vorzugsweise unter Verwendung organischer Basen (Pyridin, Imidazol, Triethylamin, 4-Dimethylamino-pyridin, Lutidin, Collidin etc.) - durchführt.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung des erfindungsgemäßen Verfahrens und der gewerblichen Verwertbarkeit der Verfahrensprodukte zur Herstellung des bekannten aldosteron-antagonistisch wirksamen 6 $\beta$ ,7 $\beta$ ; 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Dimethylen-3-oxo-17 $\alpha$ -pregn-4-en-21,17-carbolacton:

A) Ausführungsbeispiele betreffend die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen:

Beispiel 1

Ein 2 Liter-Erlenmeyerkolben, der 500 ml einer 30 Minuten bei 120° C im Autoklaven sterilisierten Nährösung aus 1 % Stärkezucker und 1 % Sojabohnenmehl, eingestellt auf pH 6,2 wird mit einer Schrägröhrchen-Kultur des Stammes *Botryodiplodia malorum* (CBS 13450) beimpft und 2 1/2 Tage auf einem Rotationsschüttler geschüttelt.

Mit dieser Anzuchtkultur wird ein 20 Liter-Vorfermenter beimpft, der mit 15 l eines 60 Minuten bei 121° C und 1,1 atü sterilisierten Mediums der gleichen Zusammensetzung wie die Anzuchtkultur gefüllt ist. Unter Zugabe von Silicon SH als Antischaummittel wird bei 29° C und 0,7 atü Druck unter Belüftung (15 l/Min.) und Rühren (220 U/Min.) 24 Stunden germiniert.

Danach werden 0,9 Liter dieser Kultur unter sterilen Bedingungen entnommen und damit ein 20 Liter-Hauptfermenter beimpft, der mit 14 l eines wie oben sterilisierten Nährmediums der gleichen Zusammensetzung wie die Vorfermenterkultur beschickt ist. Nach einer Anwachsphase von 12 Stunden unter Vorfermenterbedingungen wird eine pasteurisierte Suspension von 30 g feinstgemahlenem 3 $\beta$ -Hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylene-5-androsten-17-on in 2250 ml 1 %iger wässriger Tween-80-Lösung hinzugegeben und weiter gerührt und belüftet. Der Verlauf der Fermentation wird durch Entnahme von Proben kontrolliert, die mittels Methylisobutylketon extrahiert und dünnenschichtchromatographisch analysiert werden. Nach 48 Stunden Kontaktzeit ist die Umsetzung des

Substrates beendet. Die Kulturbrühe wird durch Zentrifugation in einer Durchlaufzentrifuge vom Pilzmycel befreit, das klare Filtrat dreimal mit je 10 l Methylisobutylketon extrahiert und die Extrakte mit dem Extrakt des gleichfalls mittels Methylisobutylketon extrahierten Mycels vereinigt. Nach Konzentrierung der Lösung im Umlaufverdampfer wird anschließend bei 50° C Badtemperatur im Vakuum im Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Den ölig-kristallinen Rückstand nimmt man in Isopropyläther auf und saugt über Papierfilter ab. Nach vierstündigem Trocknen bei 70° C im Vakuumtrockenschrank erhält man 23,6 g 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylene-5-androsten-17-on vom Schmelzpunkt 199 bis 202° C.

#### Beispiel 2

Unter den Bedingungen des Beispiels 1 werden 22,5 g 3 $\beta$ -Acetoxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylene-5-androsten-17-on mit Botryodiplodia malorum fermentiert und hierbei 16,3 g 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylene-5-androsten-17-on vom Schmelzpunkt 197-200° C erhalten.

#### Beispiel 3

Unter den Bedingungen des Beispiels 1 werden 22,5 g 3 $\beta$ -Hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylene-17 $\alpha$ -pregn-5-en-21,17-carbolacton mit Botryodiplodia malorum incubiert und dabei 16,8 g 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylene-17 $\alpha$ -pregn-5-en-21,17-carbolacton vom Schmelzpunkt 173-175° C erhalten.

- 6 -

#### Beispiel 4

Eine Lösung von 195 g 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-5-androsten-17-on in 1460 ml Pyridin wird mit 293 ml Pivalinsäureanhydrid und 31 g Dimethylaminopyridin versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 72 Stunden bei Raumtemperatur wird das Rohprodukt mit 15 l Eisswasser gefällt, abgesaugt, gewaschen und bei 60° C getrocknet. Nach dem Umkristallieren aus Aceton-Dichlormethan erhält man 185,4 g 7 $\beta$ -Hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-3 $\beta$ -pivaloyloxy-5-androsten-17-on. Schmelzpunkt 236° C.  $[\alpha]_D = -45^\circ$  (Chloroform).

#### Beispiel 5

Eine Lösung von 120 g 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-5-androsten-17-on in 1000 ml Dimethylformamid wird mit 31 g Imidazol versetzt und auf -20° C abgekühlt. Dazu tropft man innerhalb von 2 Stunden 63 g tert.-Butyl-dimethyl-chlorsilan in 450 ml Dimethylformamid und röhrt eine Stunde nach. Das Reaktionsprodukt wird mit natriumchloridhaltigem Wasser gefällt, abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in Methylenchlorid gelöst. Die Lösung wird über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Nach Chromatographie an Kieselgel mit Hexan-Aceton erhält man 128,8 g 3 $\beta$ -(tert.-Butyl-dimethylsilyloxy)-7 $\beta$ -hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-5-androsten-17-on.

#### Beispiel 6

Eine Lösung von 100 g 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-5-androsten-17-on in 2,5 l Tetrahydrofuran und 250 ml Pyridin wird auf -20° C abgekühlt und mit 88 ml Dimethyl-2-(3-methylbutyl)-silylchlorid innerhalb einer Stunde versetzt und 4 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Danach wird mit

- 7 -

mit 50 ml Methanol versetzt und im Vakuum eingeengt. Das Rohprodukt wird an Kieselgel mit Methylenchlorid-Aceton chromatographiert. Man erhält 98,5 g  $\Delta^8$ -[Dimethyl-2-(3-methyl-butyl)-siloxy]- $\Delta^7$ -hydroxy- $\Delta^{15,16}$ -methylen-5-androsten-17-on als Öl.  $[\alpha]_D = -36^\circ$  (Chloroform).

#### Beispiel 7

Eine Lösung von 15,7 g  $\Delta^8$ , $\Delta^7$ -Dihydroxy- $\Delta^{15,16}$ -methylen-5-androsten-17-on in 750 ml Methylenchlorid wird mit 9 ml Triethylamin und 200 mg Dimethylaminopyridin versetzt und auf  $-20^\circ C$  abgekühlt. Dazu tropft man innerhalb von 30 Minuten 19,4 g Tribenzylsilylchlorid in 10 ml Methylenchlorid. Man röhrt 1 Stunde bei  $-20^\circ C$  und 1 Stunde bei  $0^\circ C$ , verdünnt mit Methylenchlorid und wäscht mit 1 N Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser. Nach Trocknung über Natriumsulfat engt man im Vakuum ein. Nach Chromatographie an Kieselgel mit Hexan-Aceton erhält man 27,5 g  $\Delta^8$ -Tribenzylsilyloxy- $\Delta^7$ -hydroxy- $\Delta^{15,16}$ -methylen-5-androsten-17-on.

#### Beispiel 8

16,0 g  $\Delta^8$ , $\Delta^7$ -Dihydroxy- $\Delta^{15,16}$ -methylen- $17\alpha$ -pregn-5-en-21,17-carbolacton werden in 130 ml Dimethylformamid gelöst, die Lösung wird mit 4 g Imidazol versetzt und auf  $-20^\circ C$  gekühlt. Innerhalb von 30 Minuten tropft man 8 g tert.-Butyl-dimethylchlorsilan in 60 ml Dimethylformamid hinzu und röhrt 2 Stunden unter weiterer Kühlung. Die Reaktionslösung wird in Wasser eingegossen, das ausgefällte Produkt abfiltriert, gewaschen und getrocknet. Das Rohprodukt wird mit Aceton-Hexan an Kieselgel chromatographiert. Ausbeute 15,4 g  $\Delta^8$ -(tert.-Butyl-dimethylsilyloxy)- $\Delta^7$ -hydroxy- $\Delta^{15,16}$ -methylen- $17\alpha$ -pregn-5-en-21,17-carbolacton.

B) Ausführungsbeispiele zur gewerblichen Verwertbarkeit  
der erfindungsgemäßen Verbindungen.

Beispiel 1

- a) Eine Suspension von 160 g 7 $\alpha$ -Hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-3 $\beta$ -pivaloyloxy-5-androsten-17-on in 1600 ml Toluol wird bei 80° C, nach Zugabe von 1,6 g Vanadium(IV)-oxid-acetyl-acetonat, innerhalb von 2 Stunden mit 160 ml 80 %igen tert.-Butylhydroperoxid in 475 ml Toluol versetzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Ausbeute 171 g 5,6 $\beta$ -Epoxy-7 $\beta$ -hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-3 $\beta$ -pivaloyloxy-5 $\beta$ -androstan-17-on. Eine aus Aceton-Hexan umkristallisierte Probe schmilzt bei 220° C.  $[\alpha]_D = -12^\circ$  (Chloroform).
- b) Eine Lösung von 169 g 5,6 $\beta$ -Epoxy-7 $\beta$ -hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-3 $\beta$ -pivaloyloxy-5 $\beta$ -androstan-17-on in einem Gemisch aus je 340 ml Dichlormethan, Tetrachlormethan und Pyridin wird mit 200 g Triphenylphosphin versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird mit 310 ml Ethanol aufgerührt und filtriert. Der Filterkuchen wird mit 175 ml Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es werden 139,2 g 7 $\alpha$ -Chlor-5,6 $\beta$ -epoxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-3 $\beta$ -pivaloyloxy-5 $\beta$ -androstan-17-on erhalten. Eine analytische Probe, aus Aceton-Hexan umkristallisiert, besitzt einen Schmelzpunkt von 228° C.  $[\alpha]_D = -100^\circ$  (Chloroform).
- c) Eine Lösung von 196 g 7 $\alpha$ -Chlor-5,6 $\beta$ -epoxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-3 $\beta$ -pivaloyloxy-5 $\beta$ -androstan-17-on in 500 ml Essigsäure und 800 ml Tetrahydrofuran wird bei 70° C mit 392 g

Zinkstaub in 2 Portionen im Abstand von 30 Minuten versetzt und 1 Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Nach dem Abkühlen wird das Zink über Celite abfiltriert und mit 5 l Methylenchlorid gewaschen. Die vereinigten Filtrate versetzt man mit 1,5 l Wasser und neutralisiert unter Röhren durch Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat. Anschließend wird die organische Phase mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Durch Verreiben des erhaltenen Feststoffes mit Essigester erhält man 134,7 g 5-Hydroxy-15 $\alpha$ ,16 $\beta$ -methylen-3 $\beta$ -pivaloyloxy-5 $\beta$ -androst-6-en-17-on vom Schmelzpunkt 243° C.

- d) 134 g 5-Hydroxy-15 $\alpha$ ,16 $\beta$ -methylen-3 $\beta$ -pivaloyloxy-5 $\beta$ -androst-6-en-17-on werden in 1340 ml Tetrahydrofuran und 670 ml Methanol gelöst und nacheinander mit 40 g pulverisierten Kaliumhydroxid und 13 g Natriumperchlorat versetzt. Nach 2,5 Stunden wird in 8 l Wasser eingehürt, mit 20 %iger Schwefelsäure neutralisiert und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Nach Lösen in Methylenchlorid und Trocknung mit Natriumsulfat engt man im Vakuum ein. Durch Verreiben des erhaltenen Feststoffes mit Essigester erhält man 99,8 g 3 $\beta$ ,5-Dihydroxy-15 $\alpha$ ,16 $\beta$ -methylen-5 $\beta$ -androst-6-en-17-on vom Schmelzpunkt 198° C.
- e) Eine Lösung von 26 g 3 $\beta$ ,5-Dihydroxy-15 $\alpha$ ,16 $\beta$ -methylen-5 $\beta$ -androst-6-en-17-on in 520 ml Ethylenglycoldimethyl-ether wird mit 78 g Zink-Kupfer und 69 ml Methylenjodid 4 Stunden bei 80° C gerührt. Anschließend wird mit Methylenchlorid verdünnt, mit gesättigter Ammoniumchloridlösung

und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird an Kieselgel chromatographiert. Es werden 16,3 g 3 $\beta$ ,5-Dihydroxy-6 $\beta$ ,7 $\beta$ ;15 $\beta$ ,16 $\beta$ -dimethylen-5 $\beta$ -androstan-17-on vom Schmelzpunkt 205,5 - 207° C erhalten.

- f) 25,1 g 3 $\beta$ ,5-Dihydroxy-6 $\beta$ ,7 $\beta$ ;15 $\beta$ ,16 $\beta$ -dimethylen-5 $\beta$ -androstan-17-on werden in 500 ml Tetrahydrofuran gelöst. Unter Kühlung auf 0° C und unter Argonatmosphäre werden zu dieser Lösung 75,5 g Kaliummethyletat gegeben und anschließend unter Röhren 50,4 ml Propargylalkohol in 104 ml Tetrahydrofuran gelöst zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 20 Stunden bei 0° C gerührt und in Eiswasser eingegossen. Nach Neutralisation mit verdünnter Schwefelsäure wird der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und getrocknet. Das Rohprodukt wird an Kieselgel chromatographiert. Man erhält 25 g 17 $\alpha$ -(3-Hydroxy-1-propinyl)-6 $\beta$ ,7 $\beta$ ;15 $\beta$ ,16 $\beta$ -dimethylen-5 $\beta$ -androstan-3 $\beta$ ,5,17 $\beta$ -triol. Schmelzpunkt 202 - 203° C (Aceton).
- g) 24,5 g 17 $\alpha$ -(3-Hydroxy-1-propinyl)-6 $\beta$ ,7 $\beta$ ;15 $\beta$ ,16 $\beta$ -dimethyl-en-5 $\beta$ -androstan-3 $\beta$ ,5,17 $\beta$ -triol werden in 250 ml Tetrahydrofuran und 125 ml Methanol in Gegenwart von 3,75 g Palladium auf Kohle (10 %ig) und 0,5 ml Pyridin bis zur Aufnahme von 2 Äquivalenten Wasserstoff hydriert. Es wird vom Katalysator abfiltriert und eingedampft. Man erhält 24,7 g 17 $\alpha$ -(3-Hydroxypropyl)-6 $\beta$ ,7 $\beta$ ;15 $\beta$ ,16 $\beta$ -dimethylen-5 $\beta$ -androstan-3 $\beta$ ,5,17 $\beta$ -triol, das ohne weitere Aufreinigung in die nächste Stufe eingesetzt wird.
- h) Eine Lösung von 24,7 g 17 $\alpha$ -(3-Hydroxypropyl)-6 $\beta$ ,7 $\beta$ ;15 $\beta$ ,16 $\beta$ -dimethylen-5 $\beta$ -androstan-3 $\beta$ ,5,17 $\beta$ -triol in 247 ml Pyridin wird mit einer Lösung von 74,1 g Chrom(VI)-oxid in 247 ml Wasser und 494 ml Pyridin versetzt und 16 Stunden bei 50° C gerührt. Danach wird mit Methylen-

chlorid verdünnt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird an Kieselgel chromatographiert. Nach Umkristallisieren aus Di-isopropylether-Aceton werden 14,5 g 6 $\beta$ ,7 $\beta$ ;15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Dimethylen-3-oxo-17 $\alpha$ -pregn-4-en-21,17-carbolacton vom Schmelzpunkt 196,5 bis 197,5° C erhalten.

#### Beispiel 2

- a) 128 g 3 $\beta$ -(tert.-Butyl-dimethylsilyloxy)-7 $\beta$ -hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-5-androsten-17-on werden in 750 ml Toluol gelöst und bei 80° C mit 500 mg Vanadin(IV)-oxid-acetylacetonat versetzt. Dazu tropft man 460 ml tert.-Butyl-hydroperoxid-Lösung (aus 100 ml 80 %igem tert.-Butyl-hydroperoxid und 400 ml Toluol) und beläßt für 1,5 Stunden bei dieser Temperatur. Nach dem Abkühlen wäscht man mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung, trocknet über Natriumsulfat und dampft im Vakuum ein. Man erhält 126,5 g 3 $\beta$ -(tert.-Butyl-dimethylsilyloxy)-5,6 $\beta$ -epoxy-7 $\beta$ -hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-5 $\beta$ -androstan-17-on vom Schmelzpunkt 189° C.  $[\alpha]_D = -8,8^\circ$  (Chloroform).
- b) 126 g 3 $\beta$ -(tert.-Butyl-dimethylsilyloxy)-5,6 $\beta$ -epoxy-7 $\beta$ -hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-5 $\beta$ -androstan-17-on werden in einer Mischung von 600 ml Methylenchlorid, 600 ml Tetrachlorkohlenstoff und 300 ml Pyridin gelöst und mit 193,8 g Triphenylphosphin 2,5 Stunden gerührt. Anschließend wäscht man mit Wasser, trocknet über Natriumsulfat und engt im Vakuum ein. Nach Chromatographie an Kieselgel mit Hexan-Aceton erhält man 117,4 g 3 $\beta$ -(tert.-Butyl-dimethylsilyloxy)-7 $\alpha$ -chlor-5,6 $\beta$ -epoxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-5 $\beta$ -androstan-17-on vom Schmelzpunkt 155,5° C.  $[\alpha]_D = -87^\circ$  (Chloroform).

- c) 142 g  $3\beta$ -(tert.-Butyl-dimethylsilyloxy)- $7\alpha$ -chlor-5, $6\beta$ -epoxy- $15\beta,16\beta$ -methylen- $5\beta$ -androstan-17-on werden in 400 ml Tetrahydrofuran und 400 ml Methanol gelöst und mit 1000 ml 8 %iger Schwefelsäure 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend verdünnt man mit Ether, wäscht mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser, trocknet über Natriumsulfat und engt im Vakuum ein. Durch Verreiben des erhaltenen Feststoffes mit Diisopropylether erhält man 108 g  $7\alpha$ -Chlor-5, $6\beta$ -epoxy- $3\beta$ -hydroxy- $15\beta,16\beta$ -methylen- $5\beta$ -androstan-17-on vom Schmelzpunkt 173° C.
- d) 107,5 g  $7\alpha$ -Chlor-5, $6\beta$ -epoxy- $3\beta$ -hydroxy- $15\beta,16\beta$ -methylen- $5\beta$ -androstan-17-on wird in 500 ml Essigsäure und 500 ml Tetrahydrofuran gelöst und nach Zugabe von 324 g Zinkstaub in 3 Portionen bei Raumtemperatur 16 Stunden gerührt. Anschließend wird das Zink abfiltriert, das Filtrat mit Methylenechlorid verdünnt und mit Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat engt man im Vakuum ein. Durch Verreiben des erhaltenen Feststoffes mit Essigester erhält man 91,5 g  $3\beta,5$ -Dihydroxy- $15\beta,16\beta$ -methylen- $5\beta$ -androst-6-en-17-on vom Schmelzpunkt 196° C.

### Beispiel 3

- a) Eine Lösung von 133 g  $3\beta$ -[Dimethyl-2-(3-methyl-butyl)-silyloxy]- $7\beta$ -hydroxy- $15\beta,16\beta$ -methylen- $5$ -androsten-17-on in 740 ml wird bei 80° C mit 624 mg Vanadin(IV)-oxid-acetyl-acetonat versetzt. Dazu tropft man 470 ml tert.-Butyl-hydroperoxidlösung (aus 94 ml 80 %igen tert.-Butylhydroperoxid und 390 ml Toluol) innerhalb von 2 Stunden. Die Lösung wird eine Stunde bei dieser Temperatur nachgerührt. Nach dem Abkühlen wäscht man mit Wasser und ge-

sättigter Natriumchloridlösung, trocknet über Natriumsulfat und dampft im Vakuum ein. Man erhält 135 g 3 $\beta$ -[Dimethyl-2-(3-methyl-butyl)-silyloxy]-5,6 $\beta$ -epoxy-7 $\beta$ -hydroxy-15 $\alpha$ ,16 $\beta$ -methylen-5 $\beta$ -androstan-17-on als Öl.  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -16° (Chloroform).

- b) 134 g 3 $\beta$ -[Dimethyl-2-(3-methyl-butyl)-silyloxy]-5,6 $\beta$ -epoxy-7 $\beta$ -hydroxy-15 $\alpha$ ,16 $\beta$ -methylen-5 $\beta$ -androstan-17-on werden in einer Mischung von 1200 ml Methylenchlorid, 1200 ml Tetrachlorkohlenstoff und 600 ml Pyridin gelöst. Die Lösung wird mit 140 g Triphenylphosphin versetzt und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wäscht man mit Wasser, trocknet über Natriumsulfat und engt im Vakuum ein. Nach Chromatographie an Kieselgel mit Hexan-Aceton erhält man 126,4 g 7 $\alpha$ -Chlor-3 $\beta$ -[dimethyl-2-(3-methyl-butyl)-silyloxy]-5,6 $\beta$ -epoxy-15 $\alpha$ ,16 $\beta$ -methylen-5 $\beta$ -androstan-17-on als Öl. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -72° (Chloroform).
- c) Eine Lösung von 107 g 7 $\alpha$ -Chlor-3 $\beta$ -[dimethyl-2-(3-methyl-butyl)-silyloxy]-5,6 $\beta$ -epoxy-15 $\alpha$ ,16 $\beta$ -methylen-5 $\beta$ -androstan-17-on in einer Mischung von 500 ml Tetrahydrofuran und 500 ml Methanol wird mit 100 ml 8 %iger Schwefelsäure versetzt und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend verdünnt man mit Ether, wäscht mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser, trocknet über Natriumsulfat und engt im Vakuum ein. Durch Verreiben des erhaltenen Feststoffes mit Diisopropylether erhält man 74,5 g 7 $\alpha$ -Chlor-5,6 $\beta$ -epoxy-3 $\beta$ -hydroxy-15 $\alpha$ ,16 $\beta$ -methylen-5 $\beta$ -androstan-17-on vom Schmelzpunkt 173,5° C.

Beispiel 4

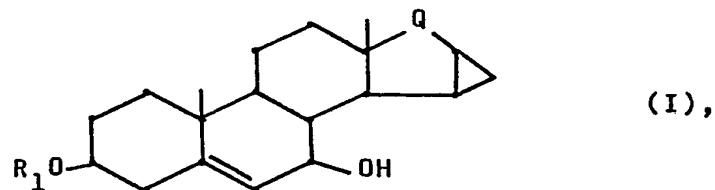
- a) 24 g  $\Delta^{\text{B}}$ -Tribenzylsilyloxy- $\beta$ -hydroxy- $15\alpha,16\beta$ -methylen- $5\alpha$ -andosten-17-on werden in 50 ml Toluol gelöst, mit 500 mg Vanadin(IV)-oxid-acetylacetonal versetzt und auf 80° C erhitzt. Dazu tropft man 75 ml tert.-Butylhydroperoxid-Lösung (10 ml 80 %igen tert.-Butylhydroperoxid in 100 ml Toluol) und beläßt für 1,5 Stunden bei dieser Temperatur. Nach dem Abkühlen wäscht man mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung, trocknet und dampft im Vakuum ein. Man erhält 24,5 g  $\Delta^{\text{B}}$ -Tribenzylsilyloxy- $5,6\beta$ -epoxy- $\beta$ -hydroxy- $15\alpha,16\beta$ -methylen- $5\beta$ -androstan-17-on.
- b) 24 g  $\Delta^{\text{B}}$ -Tribenzylsilyloxy- $5,6\beta$ -epoxy- $\beta$ -hydroxy- $15\alpha,16\beta$ -methylen- $5\beta$ -androstan-17-on werden in einem Gemisch von 250 ml Methylenchlorid, 250 ml Tetrachlorkohlenstoff und 125 ml Pyridin gelöst und mit 24 g Triphenylphosphin 3 Stunden gerührt. Anschließend wäscht man mit Wasser, trocknet über Natriumsulfat und engt im Vakuum ein. Nach Chromatographie an Kieselgel mit Hexan-Aceton erhält man 19,8 g  $\Delta^{\text{B}}$ -Tribenzylsilyloxy- $7\alpha$ -chlor- $5,6\beta$ -epoxy- $15\alpha,16\beta$ -methylen- $5\beta$ -androstan-17-on.
- c) 19 g  $\Delta^{\text{B}}$ -Tribenzylsilyloxy- $7\alpha$ -chlor- $5,6\beta$ -epoxy- $15\alpha,16\beta$ -methylen- $5\beta$ -androstan-17-on werden in 50 ml Tetrahydrofuran und 50 ml Methanol gelöst und mit 15 ml 8 %iger Schwefelsäure 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend verdünnt man mit Ether, wäscht mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser, trocknet über Natriumsulfat und engt im Vakuum ein. Durch Verreiben des erhaltenen Feststoffes mit Diisopropylether erhält man 8,7 g  $7\alpha$ -Chlor- $5,6\beta$ -epoxy- $\Delta^{\text{B}}$ -hydroxy- $15\alpha,16\beta$ -methylen- $5\beta$ -androstan-17-on vom Schmelzpunkt 172° C.

Beispiel 5

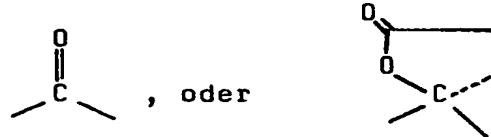
- a) 15,0 g 3 $\beta$ -(tert.-Butyl-dimethylsilyloxy)-7 $\beta$ -hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-17 $\alpha$ -pregn-5-en-21,17-carbolacton werden analog den Vorschriften 2 a) bis 2 d) in 3 $\beta$ ,5-Dihydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-5 $\beta$ ,17 $\alpha$ -pregn-6-en-21,17-carbolacton überführt. Ausbeute 10,3 g. Schmelzpunkt 236° C.
- b) 5 g 3 $\beta$ ,5-Dihydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-5 $\beta$ ,17 $\alpha$ -pregn-6-en-21,17-carbolacton werden in 100 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 15 g Zink-Kupfer versetzt. Dazu tropft man innerhalb von 7 Stunden 13,2 ml Methylenjodid so zu, daß die Temperatur 30° C nicht übersteigt und röhrt weitere 10 Stunden bei Raumtemperatur. Zur Entfernung des Metalls wird über Celite filtriert, das Filtrat mit Methylenchlorid verdünnt und mit gesättigter Ammoniumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird an Kieselgel chromatographiert. Man erhält 4,4 g 3 $\beta$ ,5-Dihydroxy-6 $\beta$ ,7 $\beta$ ;15 $\beta$ ,16 $\beta$ -dimethylen-5 $\beta$ ,17 $\alpha$ -pregnan-21,17-carbolacton als Öl.
- c) 2,8 g 3 $\beta$ ,5-Dihydroxy-6 $\beta$ ,7 $\beta$ ; 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -dimethylen-5 $\beta$ ,17 $\alpha$ -pregnan-21,17-carbolacton werden in 28 ml Pyridin gelöst und mit einer Lösung von 15 g Chrom(VI)-oxid in 28 ml Pyridin und 14 ml Wasser versetzt und 16 Stunden bei 50° C gerührt. Nach dem Abkühlen wird mit Methylenchlorid verdünnt, mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird an Kieselgel chromatographiert. Man erhält 2,3 g 6 $\beta$ ,7 $\beta$ ;15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Dimethylen-3-oxo-17 $\alpha$ -pregn-4-en-21,17-carbolacton vom Schmelzpunkt 198 bis 198,5° C.

Patentansprüche

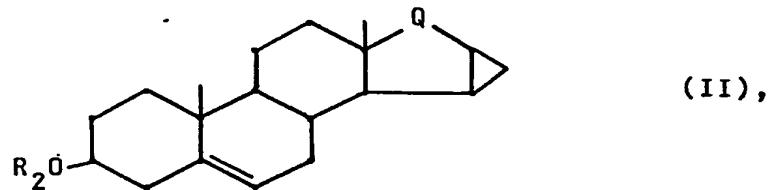
1. Verfahren zur Herstellung von  $3\beta,7\beta$ -Dihydroxy- $\Delta^5$ -steroiden der allgemeinen Formel I



worin Q die Gruppierungen



und  $R_1$  ein Wasserstoffatom, eine Trimethylacetylgruppe, eine tert.-Butyl-dimethylsilylgruppe, eine Dimethyl-2-(3-methylbutyl)-silylgruppe oder eine Tribenzylsilylgruppe darstellen,  
dadurch gekennzeichnet, daß man ein  $3\beta$ -Hydroxy- $\Delta^5$ -steroid der allgemeinen Formel II



worin Q die obengenannte Bedeutung besitzt und R<sub>2</sub> ein Wasserstoffatom oder eine Alkanoylgruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellt, mit einer Kultur von Botryodiplodia malorum fermentiert, und gewünschtenfalls die erhaltenen 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxy- $\Delta^5$ -steroide der allgemeinen Formel I mit Trimethylacetanhydrid, tert.-Butyl-dimethyl-silylchlorid, Dimethyl-2-(3-methyl-butyl)-silylchlorid oder Tribenzylsilylchlorid umsetzt.

2. Verfahren zur Herstellung von 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxysteroiden gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Fermentation mit einer Kultur von Botryodiplodia malorum (CBS 13 450) durchführt.

0051143



Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 81 10 7458

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, Band 75, Nr. 11, 13. September 1971, Seite 142, Nr. 72841w            Columbus, Ohio, U.S.A.            H.J. BRODIE et al.: "Microbiological hydroxylation of estr-4-ene-3, 17-dione"            &amp; BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 1971, 239(1), 103-110            * Zusammenfassung *</p> <p>---</p> <p>DA EP - A - 0 014 991 (F. HOFFMANN-LA ROCHE &amp; CO.)            * Ansprüche *</p> <p>---</p> <p>A US - A - 3 429 778 (SAMUEL CHENG PAN)</p> <p>-----</p>	1,2	C 12 P 33/06 C 07 J 53/00/ C 07 J 71/00
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.)
			C 12 P 33/06 C 07 J 53/00
			KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE
			X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument
	Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.		
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
Den Haag	22.01.1982	HENRY	